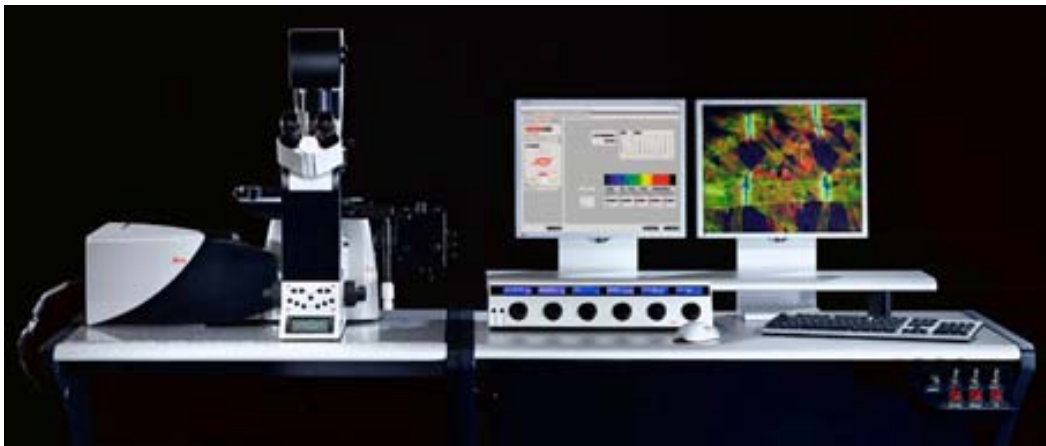


Manuel d'utilisation du microscope confocal SP5



- 1- introduction du système
- 2- démarrage du système
 - 2a allumer la lampe
 - 2b allumer microscope et PC
 - 2c mise sous tension de la tête scan
 - 2d mise sous tension de la ventilation laser
 - 2e ouvrir la session TCS-user
 - 2f démarrer le logiciel LAS-AF – choix de scan
 - 2g pré-réglages - configuration
- 3- acquérir une image XY à 1 couleur
 - 3a les paramètres d'illumination
 - 3b le format de l'image
 - 3c la vitesse de scan
 - 3d le zoom
 - 3e la rotation
 - 3f le pinhole
 - 3g le moyennage
 - 3h les modes d'acquisition live/capture image
- 4- acquérir une image XY à plusieurs couleurs
 - 4a acquisition simultanée
 - 4b acquisition séquentielle
- 5- acquérir une image XY sur plusieurs positions
 - 5a établir une carte de l'échantillon
 - 5b définir des positions éparpillées
- 6- acquérir des piles d'images
 - 4a série en z
 - 4b cinétique
 - 4c spectres
- 7- sauver ses données
- 8- changer de scanner pendant une séance
ou comment réagir en cas de bug
- 9- éteindre le système

1- introduction du système

Le microscope confocal Leica de type SP5-AOBS-Tandem a été installé dans notre service durant les mois de avril-mai 2006. Cet équipement est relativement complet et permet un nombre varié d'applications.

*double statif

La tête confocale peut être installée soit sur le microscope inversé DMI6000 (configuration par défaut), soit sur le microscope droit DM6000 (à la demande).

Seul le personnel du Service imagerie est habilité à permuter la tête confocale.

*Tandem scanner

La tête confocale SP5 est équipée de deux scanners:

- un scan conventionnel à vitesse de scan variable
- un scan rapide 8000Hz dit "resonant scanner" particulièrement adapté à l'imagerie du vivant.

*AOBS

Notre système est implémenté du système AOBS (Acousto Optical Beam Splitter, brevet Leica) qui de ce fait supprime l'utilisation des filtres dichroïques en mode scan.

*platines

Chaque statif est équipé :

- d'une surplatine vous garantissant un repositionnement ultrarapide et précis de la platine en Z (Z-galvo) (précision de 40 nm sur une épaisseur de 1.5 mm)
- d'une platine motorisée XY vous permettant de faire du mapping sur votre échantillon et de reconstituer l'image globale, ou d'enregistrer des positions éparpillées sur votre échantillon et de vous repositionner sur ces différents points pendant une cinétique par exemple.

*les sources d'excitation:

- diode (50mW) : 405 nm
- laser Argon (100mW): 458, 476, 488, 496, 514 nm
- diode 561 nm (10mW) : 561 nm
- laser He/Ne (10mw) : 633 nm

*3 photomultiplicateurs en fluorescence de 400 à 800 nm et 1 photomultiplicateur Trans (Bright field, DIC)

*les objectifs communs aux deux statifs:

- HC PL APO 20x/0.7 imm Corr CS
- HC PL APO 40x/1.25-0.75 Oil CS
- HCX PL APO 63x/1.4-0.6 Oil CS
- HC PL APO 20x/0.7 CS
- HCX PL APO 40x/0.75 UV I

*les filtres :

- combinaison filtres A (exc. 340-380/ dichr. 400 / emission LP 425)
- combinaison filtres I3 (exc. 450-490/ dichr. 510 / emission LP 515)
- combinaison filtres N2.1 (exc. 515-560/ dichr. 580 / emission LP 590)
- combinaison filtres BGR (triple bande : exc. 420/30 - 495/15 - 570/20
dichr. 415/510/590
emission 465/20-530/30-640/40)
- combinaison filtres CFP/YFP

2- démarrage du système

a- allumer la lampe mercure 100W (O à I)



b- allumer sur le contrôleur PC/microscope

la diode du bouton doit s'allumer – l'ordinateur et le microscope démarrent

attendre 2-3 secondes

c- allumer le Scanner Power

la diode du bouton doit s'allumer

attendre 2-3 secondes

d- mise sous tension du laser et de sa ventilation

allumer le bouton "Laser Power" – la diode du bouton s'allume

tourner la clé du "Laser Emission" de Off 0 à ON 1 – la diode au dessus de la clé s'allume

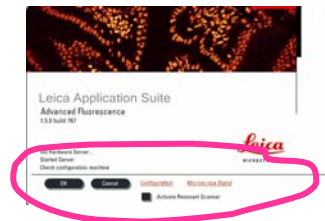
attendre 2-3 secondes

e- sur l'ordinateur : ouvrir la session TCS-user (pas mot de passe)

f- démarrer le logiciel LAS-AF : (situé au milieu du bureau)



Au démarrage, apparaît alors la fenêtre suivante:



**-vérifier le Microscope Stand : cliquer dessus, normalement le logiciel a déjà sélectionné le microscope actif : DMI6000 pour l'inversé ou DM6000 pour le droit; si ce n'est pas le cas, le sélectionner.*

-vérifier la configuration : choix du logiciel LAS AF: Machine

Simulator LAS Life

Simulator SP5

Simulator SPE

Choisir Machine si ce n'est pas déjà le cas

***Attention:** dès l'ouverture du logiciel, choisir le mode de scanner:

-pour le scan conventionnel : la case Resonant Scanner ne doit pas être cochée, puis OK

-pour le Resonant Scanner : cocher la case Activate Resonant Scanner puis OK



*Pendant l'initialisation, le logiciel demande s'il doit ou non initialiser la platine motorisée XY:

"initialize stage DMI6000?"

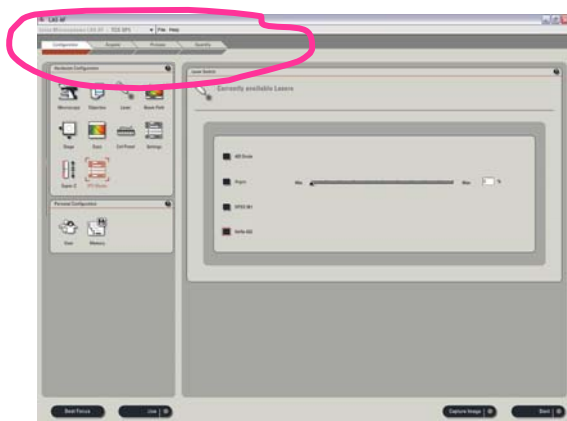
-si la platine n'est pas utilisée pendant la séquence, cliquer sur NO

-si la platine est utilisée pendant la session, alors vérifier que la tourelle des objectifs est en position basse et répondre YES.

2- démarrage du système

g- pré-réglage - configuration

A l'ouverture du logiciel, sélectionner l'onglet "Configuration":



-microscope :

Seul le personnel du Service Imagerie est autorisé à lancer le logiciel de configuration du statif, par Run LAS



-objectifs :

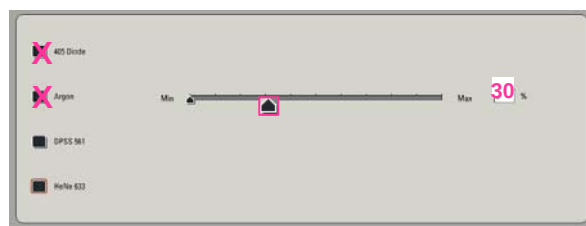
accès à la liste des objectifs enregistrés et leur position sur la tourelle des objectifs – il est possible d'interchanger les objectifs entre le statif droit et inversé en respectant leur ordre sur la tourelle



-lasers :

cocher les lasers ou diodes à utiliser pendant la session.

Pour le laser Argon: cocher la case, puis déplacer le curseur jusqu'à 30%.



2- démarrage du système

g- pré-réglage - configuration

Le "Control Panel"



Le Control Panel est un raccourci de fonctions existantes dans le logiciel. Il existe une configuration de base, mais une autre fonction peut être attribuée à chaque bouton selon la volonté de l'utilisateur en cliquant sur Ctrl Panel.

La configuration par défaut de gauche à droite est la suivante:

- Smart Gain: le gain de chaque détecteur PMT
- Smart Offset: l'offset de chaque PMT
- Scan Field Rotation: rotation de la zone scannée (en degré)
- Pinhole
- zoom
- Z position

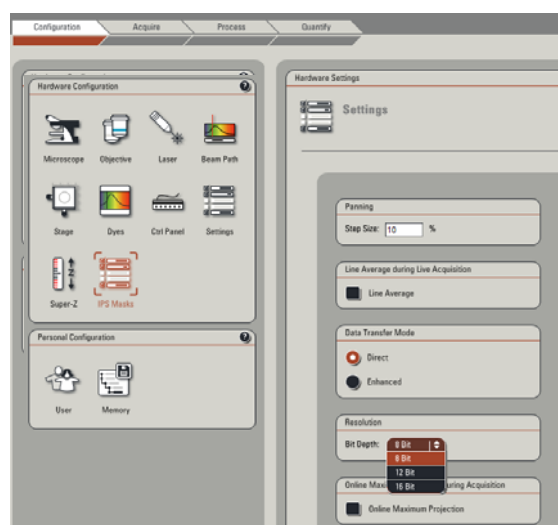


-settings:

Choisir le nombre de bits attribués à votre image : 8, 12 ou 16 bits. Par défaut, 8 bits est sélectionné.

Possibilité d'acquérir l'image Live en image moyennée en cochant la case: Line Average during Live Acquisition

Cocher la case "Online Maximum Projection during acquisition" pour obtenir la projection maximale à la fin d'une pile en Z au cours d'une acquisition, par exemple une cinétique XYZt



2- démarrage du système

g- pré-réglage - configuration

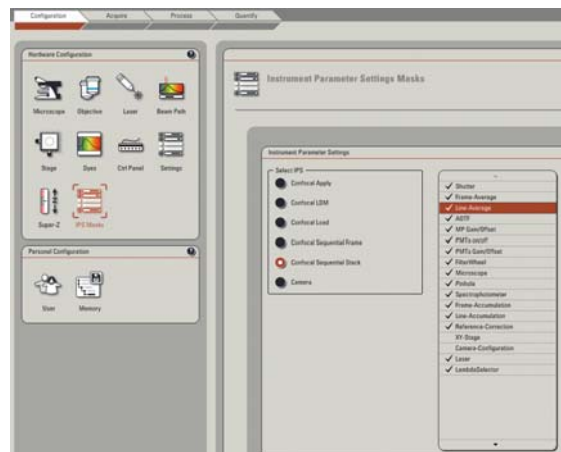


-IPS Masks

Sélectionner “Confocal Sequential Stack”

Puis cocher Line Average, Frame average, Line accumulation, Frame accumulation

Cette fonction vous permet d'acquérir vos images séquentielles avec des moyennages et des accumulations différents pour chaque image (Scan 1, Scan 2....)



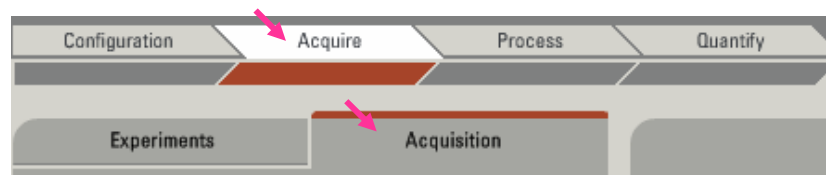
3- acquérir une image XY à 1 couleur

Sélectionner l'onglet “Acquiere” : dessous apparaissent les onglets :

-”Experiments” : liste des dossiers et des fichiers image

-”Acquisition” : les différentes fenêtres de paramètre d'acquisition

Sélectionner l'onglet “Acquisition”



En fonction du mode d'acquisition sélectionnée, différentes fenêtres apparaissent dans l'onglet “Acquisition”. Le mode d'acquisition par défaut est XYZ et les fenêtres ouvertes sont:

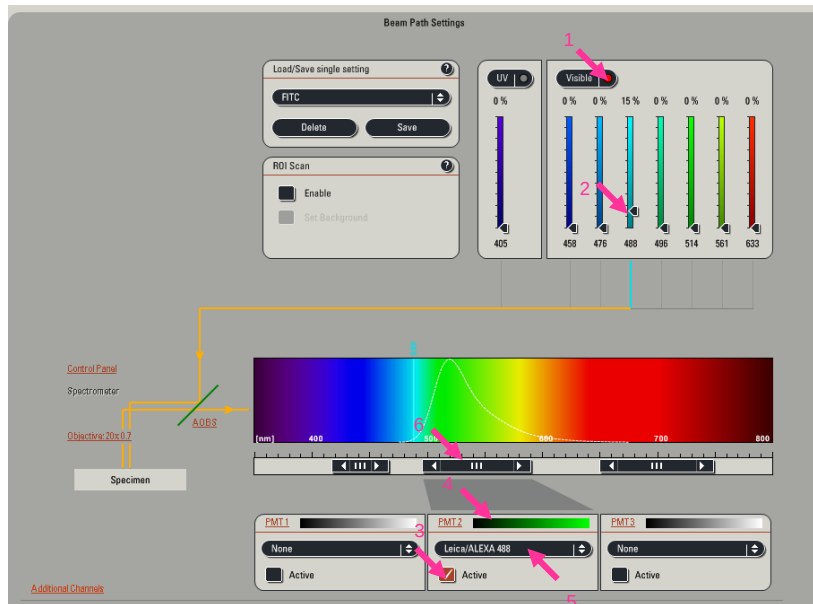
-Acquisition Mode

-XY

-Z-stack

3- acquérir une image XY à 1 couleur

a- définir les paramètres d'illumination



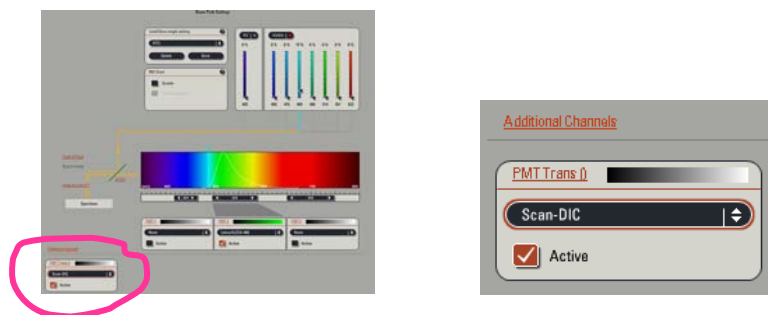
Pour une image en fluorescence

-soit choisir des paramètres déjà enregistrés : cliquer sur Load/Save single setting et sélectionner le programme

-soit configurer soi-même le scan:

- 1) activer le laser désiré : cliquer sur UV ou Visible
- 2) augmenter le curseur de la raie laser : ex: 488nm à 15%
- 3) sélectionner un PMT: cocher la case "Active" sous le PMT désiré
- 4) choisir une fausse couleur à attribuer à l'image
- 5) sélectionner un spectre d'émission de référence de votre fluorophore
- 6) paramétrer le PMT : choisir les longueurs d'onde à récupérer :
soit en faisant glisser les extrémités du curseur du PMT
soit en double cliquant sur le PMT et entrer les longueurs d'onde min et max

Pour une image en lumière transmise



- 1) appuyer sur Additional Channels
- 2) activer le PMT Trans en cochant la case
- 3) sélectionner le mode d'acquisition : BF pour Bright Field / Pol pour lumière polarisée / DIC pour Differential Interference Contrast
- 4) activer le laser désiré : cliquer sur UV ou Visible
- 5) augmenter le curseur de la raie laser : ex: 488nm à 15%

3- acquérir une image XY à 1 couleur

b- le format de l'image

dans la fenêtre XY, choisir avec le menu déroulant le nombre de pixels à attribuer à l'image

c- la vitesse de scan

*pour une utilisation du scanner conventionnel: choisir une vitesse de scan : au dessus de 400Hz, un zoom est automatiquement attribué.

*pour le resonant scanner: la vitesse de 8000Hz est fixe

d- le zoom

*par défaut, le zoom est de 1 sauf pour:

-une vitesse de scan sup. à 400Hz zoom automatique

-le resonant scanner: zoom de 4 par défaut que l'on peut baisser à 1.7 minimum.

*pour augmenter le zoom au centre de l'image: augmenter le grâce au curseur "zoom factor" ou au control panel bouton zoom

*pour zoomer dans une région déterminée: cliquer sur le zoom in, puis sélectionner l'outil "rectangle" sur la bande gauche de l'image et sélectionner la zone d'intérêt sur l'image.

e- la rotation de la zone scannée

Par défaut, l'angle de rotation est de 0. Modifier l'angle avec le curseur "Rotation" ou le Control Panel bouton "Scan Field rotation".

f- le pinhole

Cliquer sur le bouton "Pinhole", une nouvelle fenêtre apparaît:

Cliquer sur "Airy1" pour la meilleure résolution confocale, sinon modifier le curseur ou modifier le pinhole par le bouton du "Control Panel".

g- le moyennage

L'image finale acquise peut être une image moyennée de plusieurs passages du laser:

Line Average: ce moyennage est effectué après chaque ligne

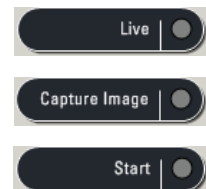
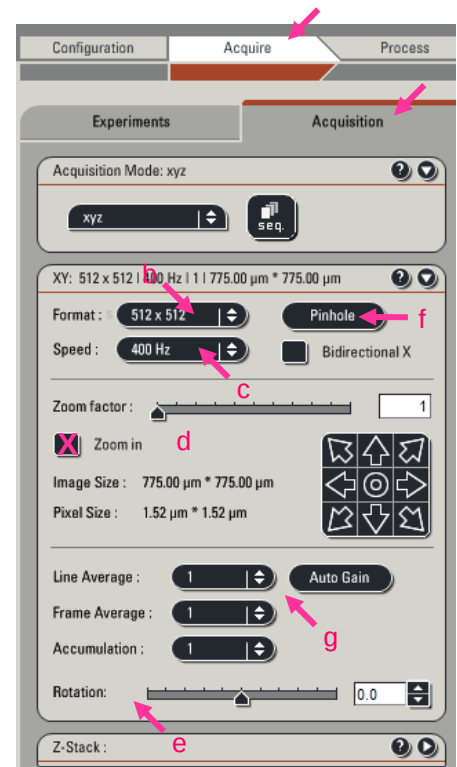
Frame Average : ce moyennage se fait après chaque image

h- l'acquisition

L'icône "Live" en bas de la fenêtre écran gauche permet de faire une acquisition en continu. Le laser balaie l'échantillon, l'image apparaît alors sur l'écran de droite. C'est alors le moment de régler le gain et l'offset du PMT avec le Control Panel.

L'icône "Capture image" concerne l'acquisition d'une image moyennée sur 1 plan.

L'icône "Start" enclenche l'acquisition d'une séquence d'images.



3- acquérir une image XY à 1 couleur

h- la visualisation de l'image

l'image apparaît sur l'écran de droite et des icônes apparaissent à gauche de cet écran



La flèche permet de sélectionner une image, une échelle ou une région déjà définies

Pour indiquer une échelle dans l'image: cliquer sur l'icône échelle μ , déplacer la souris sur l'image, clic gauche de début de l'échelle, déplacer la souris, clic gauche pour fin de l'échelle. Automatiquement, l'échelle se dessine avec la longueur indiquée du trait dessiné. Clic droit sur l'échelle puis Properties pour définir une longueur précise. La longueur de la barre s'adapte à la longueur indiquée.

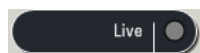
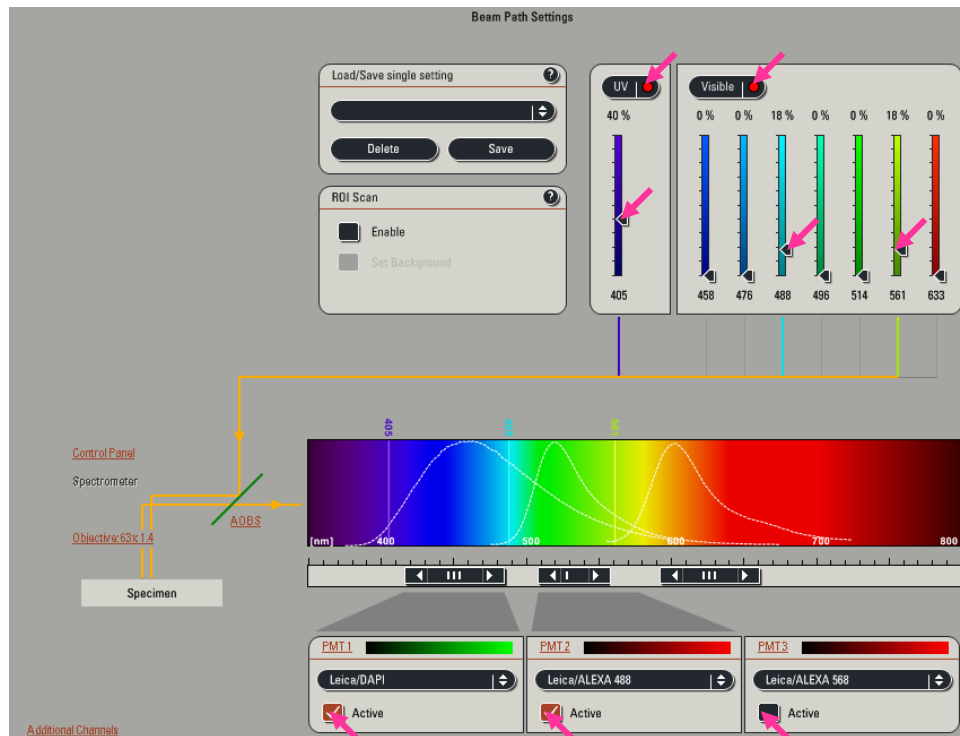
Les fausses couleurs: en cliquant sur cet icône, on change la gamme couleur : en niveau de gris, en dégradé d'une couleur choisie au niveau du PMT ou en couleur Glow O&U qui correspond à un dégradé de orange-marron avec la valeur 0 en vert et la valeur maximale (255 en 8 bits) en bleu. Cette gamme couleur Glow O&U est très adapté pour les réglages de gain et Offset du PMT.

4- acquérir une image XY à plusieurs couleurs

a- acquisition simultanée

Ce mode d'acquisition consiste à exciter avec plusieurs raies laser et récolter les fluorescences émises avec 2 ou 3 PMTs maxi simultanément.

Dans les paramètres d'illumination, il suffit de définir les lasers et la puissance des raies laser à utiliser ainsi que d'activer les PMT choisis: cocher PMT, choisir une pseudocouleur et un spectre de référence. Exemple d'image 3 couleurs: DAPI (diode 405, PMT 1), Alexa 488 (raie 488, PMT2), Alexa 568 (raie 561, PMT3).



Appuyer sur "Live".



Apparaît alors sur l'écran de droite X cadres pour X couleurs.
Cliquer sur l'icône fausse couleur pour sélectionner la gamme Glow O&U.

Cliquer sur le premier cadre, régler le gain par le "Control Panel" "Smart Gain" ainsi que l'offset. Sélectionner l'autre cadre et régler de même le gain et l'offset.



Arrêter le "Live".
Régler le format de l'image, le moyennage, puis "Start".

Visualisation des images

Canal 1

Canal 2

Canal 3.....

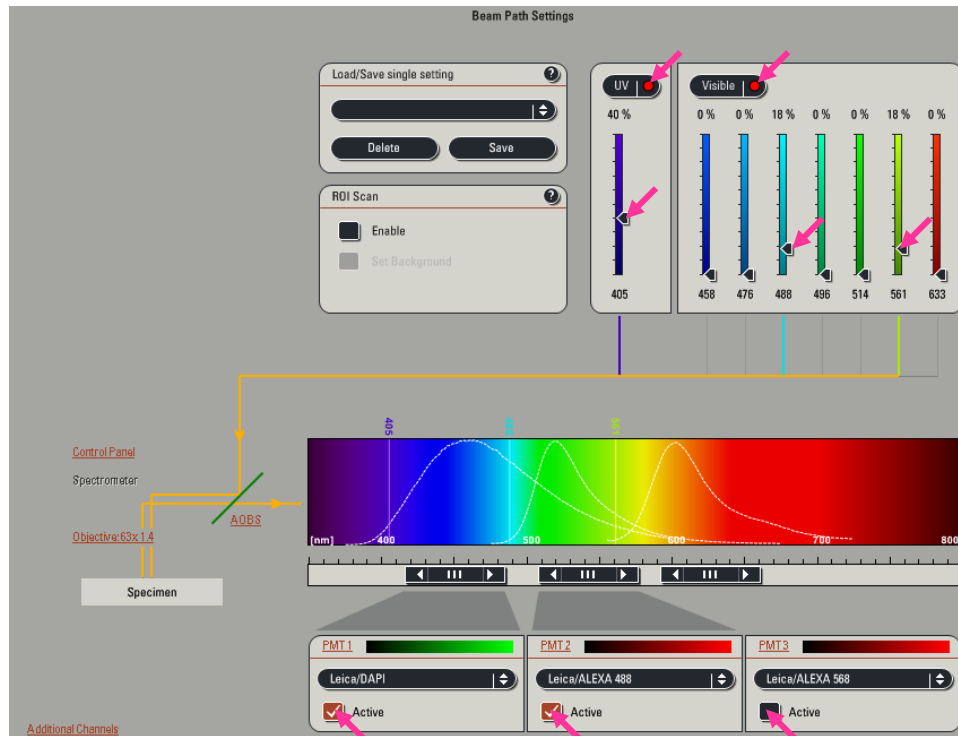
Superposition des différents canaux

4- acquérir une image XY à plusieurs couleurs

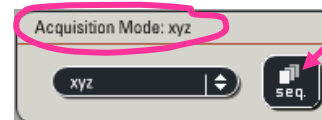
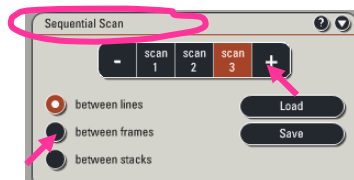
b- acquisition séquentielle

Ce mode d'acquisition consiste à acquérir une image de chaque fluorophore l'une après l'autre. Il faut impérativement utiliser cette procédure en cas d'étude de co-localisation.

*Dans un premier temps, cliquer sur UV et/ou visible et choisir une puissance laser pour toutes les raies utilisées pendant l'expérience ainsi que tous les PMTs qui seront utilisés. Même procédure que pour l'acquisition simultanée.



*Dans l'onglet Acquisition Mode, cliquer sur l'icône "Seq" Apparaît alors un nouvel onglet "Sequential Scan"



Cliquer sur "+" pour rajouter autant de scans que de fluorophores à détecter.

Choisir ensuite "between frames"

Cliquer sur Scan 1: éliminer le laser ou les raies laser et PMTs qui ne seront pas utilisés pour le 1^{er} fluorophore. "Live" régler le gain et l'offset du PMT. "Stop Live". Fixer le moyennage et/ou l'accumulation de ce scan.

Cliquer sur Scan 2: éliminer le laser ou les raies laser et PMTs qui ne seront pas utilisés pour le 2^{ème} fluorophore. "Live" régler le gain et l'offset du PMT. "Stop Live". Fixer le moyennage et/ou l'accumulation de ce scan.

Cliquer sur Scan 3: éliminer le laser ou les raies laser et PMTs qui ne seront pas utilisés pour le 3^{ème} fluorophore. "Live" régler le gain et l'offset du PMT. "Stop Live". Fixer le moyennage et/ou l'accumulation de ce scan.

Puis, "Start"



Visualisation des images: voir acquisition simultanée

5- acquérir une image XY sur plusieurs positions

Le microscope inversé et le microscope droit sont équipés d'une platine motorisée qui permet d'enregistrer des coordonnées XY et de scanner en différents points. Au démarrage du logiciel (pour le scan conventionnel comme pour le RS), il faut avoir répondu yes à la question "initialize stage DMI6000?" pour avoir accès aux icônes contrôlant la platine motorisée.

a- établir une carte de l'échantillon

Le principe est de déterminer le début (en haut à gauche) et la fin (en bas à droite) de la zone à scanner. La platine se déplacera alors de champ en champ pour faire la carte totale de l'échantillon.

*Dans l'onglet "Configuration":

*Dans l'onglet "Acquire", puis l'onglet "Acquisition": cliquer sur l'icône Map dans Acquisition Mode, une nouvelle fenêtre apparaît: "Tile Scan"

*Déterminer les paramètres d'acquisition d'une ou plusieurs couleurs sur la position où les fluorescences sont les plus élevées.

Etre en acquisition "Live", se mettre en position en haut à gauche de l'échantillon puis enregistrer cette position en cliquant sur



Toujours, pendant l'acquisition "Live", déplacer l'échantillon à l'aide du Joystick en position bas droite de l'échantillon, puis recliquer sur



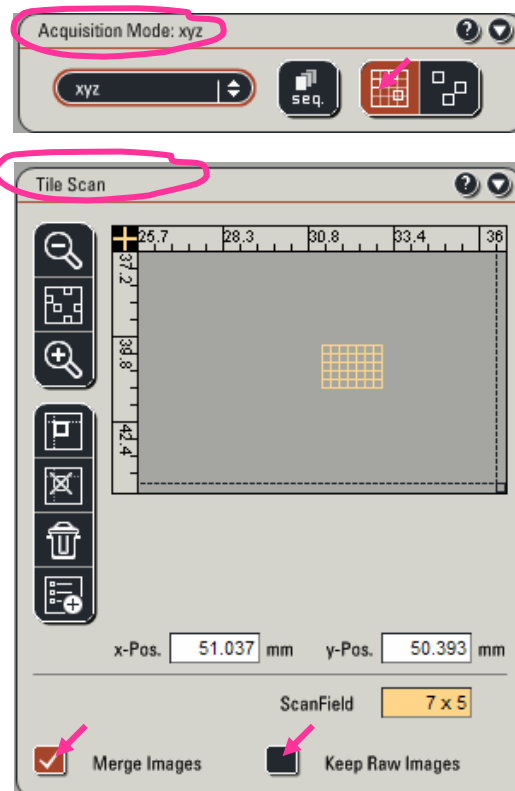
Lorsque l'icône  est activé, tous les champs à

scanner apparaissent. Leur nombre est donné automatiquement dans "Scan Field".

Le logiciel peut reconstruire automatiquement l'échantillon avec tous les champs acquis: clic sur "Merge Images".

Pour pouvoir sauvegarder chaque champ, clic sur "Keep Raw Images".

Puis "Start".



5- acquérir une image XY sur plusieurs positions

b- enregistrer des positions aléatoires

Le principe est de déterminer les différents champs répartis de manière aléatoire et d'acquérir des images ou stacks sur ces différents points. Le scanner ira automatiquement d'une position à l'autre. Cette procédure est particulièrement appréciée pour des cinétiques et de multiplier ainsi les points expérimentaux.

*Dans l'onglet "Acquire", puis l'onglet "Acquisition": cliquer sur l'icône Point dans Acquisition Mode, une nouvelle fenêtre apparaît: "Mark & Find"



*Déterminer les paramètres d'acquisition d'une ou plusieurs couleurs.

*Aux oculaires, choisir une région intéressante. Sur le logiciel, faire une image "Live", affiner la position XY et Z, Fixer la position Z begin et Z end ainsi que le pas. Stop Live, puis enregistrer la position:

-cliquer sur l'icône



les coordonnées X-pos, y-Pos et z-Pos (begin, end, pas) sont enregistrées comme position 1.

*Rechoisir une autre position aux oculaires, puis recommencer la procédure.

*Pour supprimer une position: choisir avec le curseur la position à éliminer, puis clic sur l'icône:



*Pour modifier une position:

-choisir la position à modifier avec le curseur (Position2 par exemple)

-cliquer sur l'icône

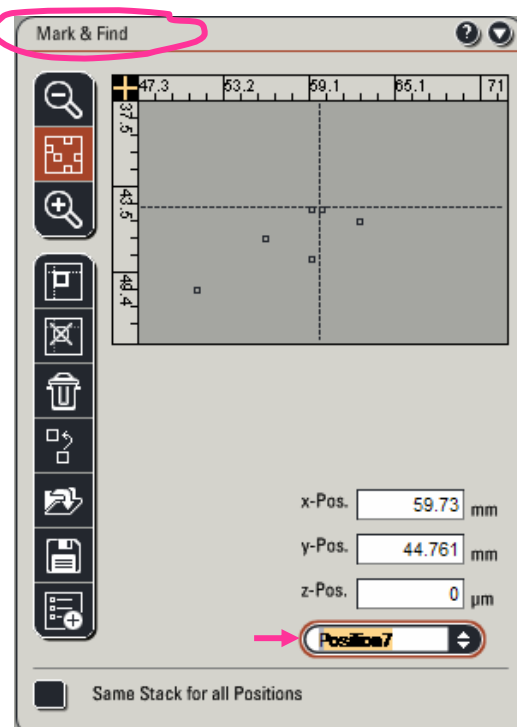


-modifier la position X, Y, Z avec le joystick

-recliquer sur l'icône



Lorsque toutes les positions sont enregistrées, commencer l'acquisition: Start



6- acquérir des piles d'images

a- série en z

Le but est de faire une acquisition sur plusieurs plans en profondeur dans l'échantillon: la dimension en z.

*Dans l'onglet "Acquisition", choisir à l'aide du curseur dans Acquisition Mode, le mode "xyz" ou "xyzt"

*Ouvrir la fenêtre Z-stack

*Faire une acquisition "Live" sur les paramètres ou couleurs qui vont déterminer le mieux le début et la fin de la pile d'images.

*Modifier la position Z à l'aide du Control Panel bouton "Z-position", se placer en début de la pile à acquérir, cliquer sur la flèche près de Begin. La position Z est enregistrée lorsque cette flèche est marron. Cliquer jusqu'à ce que cette flèche soit marron.

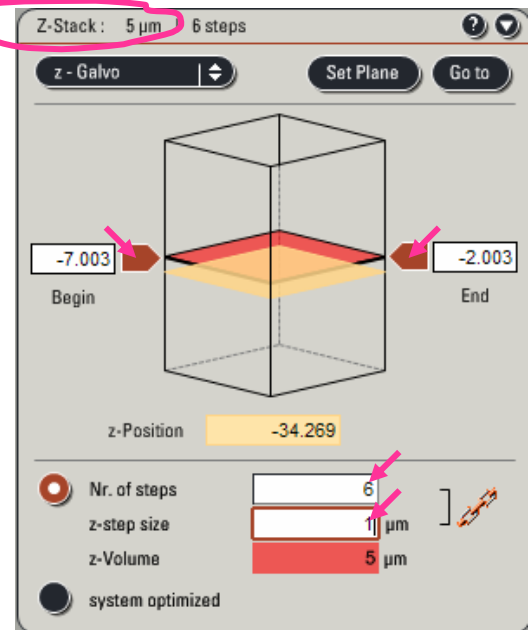
*Remodifier la position Z à l'aide du Control Panel "Z-position", et se placer en fin de pile à acquérir, cliquer sur la flèche près de End. La position Z est enregistrée lorsque cette flèche est marron. Cliquer jusqu'à ce que cette flèche soit marron.

*Stop Live

*La distance entre les deux positions Z fixées apparaît en dessous dans "z-Volume".

-soit déterminer le nombre de plans à réaliser dans Nr. of steps puis Enter, le z-step size est alors calculé automatiquement

-soit déterminer la distance souhaitée entre deux plans dans z-step size, puis Enter. Le nombre de plans est alors calculé automatiquement.



*Pour lancer l'acquisition de la série z, appuyer sur "Start"

Visualisation des images (écran de droite)

Superposition des images (Overlays)

Projection Maximale

b- cinétique

Le but est de faire une acquisition répétée au cours du temps.

*Dans l'onglet "Acquisition", choisir à l'aide du curseur dans Acquisition Mode, le mode "xyt" ou "xyzt"

*Ouvrir la fenêtre "t"

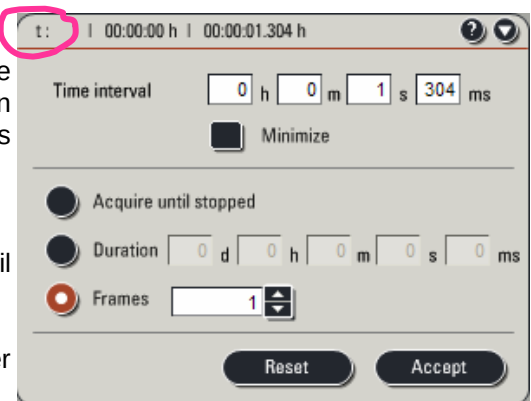
*Définir l'intervalle de temps entre deux images avec "Time interval": soit fixer un temps voulu, soit faire une acquisition répétée la plus rapide possible en cochant Minimize (temps nécessaire pour faire un scan).

*Définir la durée totale de l'acquisition:

-Soit acquisition arrêtée manuellement: clic sur Acquire until stopped.

-soit remplir les cases jour, heure, min, sec et msec de Duration

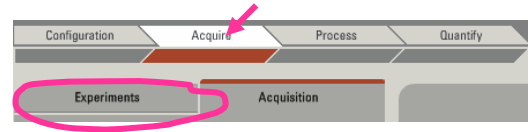
-soit définir le nombre de fois que l'on souhaite répéter l'acquisition avec Frames.



*Cliquer sur Accept, puis Start

7- sauver ses données

Sélectionner l'onglet "Acquire" : dessous apparaissent les onglets :
- "Experiments" : liste des dossiers et des fichiers image



Les expériences apparaissent sous forme de dossiers et les images sous forme de fichiers.

*renommer les fichiers: clic droit souris, rename "Series1", donner le nouveau nom.

*sauver l'expérience:

-clic sur Save All

-fenêtre interactive : créer un nouveau dossier à son nom dans le dossier correspondant au mois et au jour de la session.

-donner un nom à l'expérience. L'expérience est alors sauvée en .lif

*sauvegarder les paramètres d'acquisition: sur le fichier de l'image, clic droit, Properties. Sauver la nouvelle fenêtre qui s'ouvre sous format .xml. Faire cette sauvegarde pour toutes les acquisitions.

*exporter l'expérience en .tif

-à la fin de l'acquisition, exporter globalement toutes les images en .tif: sur le dossier de l'expérience, clic droit export experiment as TIFF. Fenêtre interactive: cocher:

8- changer de scanner pendant une séance ou comment réagir en cas de bug

a) quitter le logiciel

b) sortir de la session: en bas du bureau, appuyer sur start, puis Log Out



c) éteindre sur le contrôleur le "Scanner Power"

d) attendre une dizaine de secondes

e) allumer sur le contrôleur le "Scanner Power"

f) réouvrir la session TCS-user, pas de mot de passe

g) redémarrer le logiciel LAS-AF au milieu du bureau

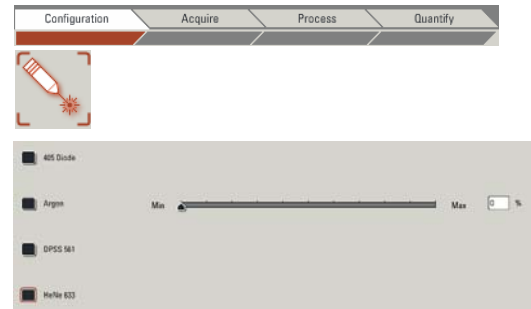
h) Lorsque le logiciel démarre, cocher ou non Activate Resonant Scanner

i) Recommencer la procédure de démarrage du système à partir de (2-g)

9- éteindre le système

a- éteindre les lasers:

- *dans l'onglet "Configuration", sélectionner l'icône "Lasers".
- *baisser le curseur à 0 du laser Argon, puis décocher tous les lasers ou diodes allumés



b- tourner la clé du "Laser Emission" de ON1 à Off 0

c- quitter le logiciel LAS-AF : File / Exit

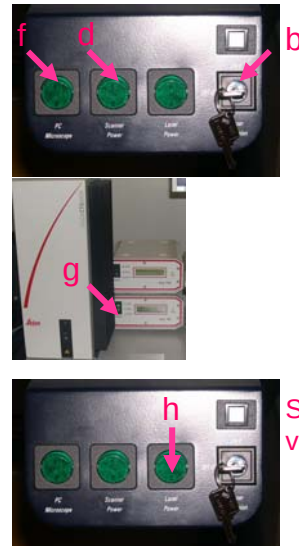
d-éteindre sur le controleur "Scanner Power"

e- éteindre l'ordinateur

f- éteindre sur le controleur "PC/microscope"

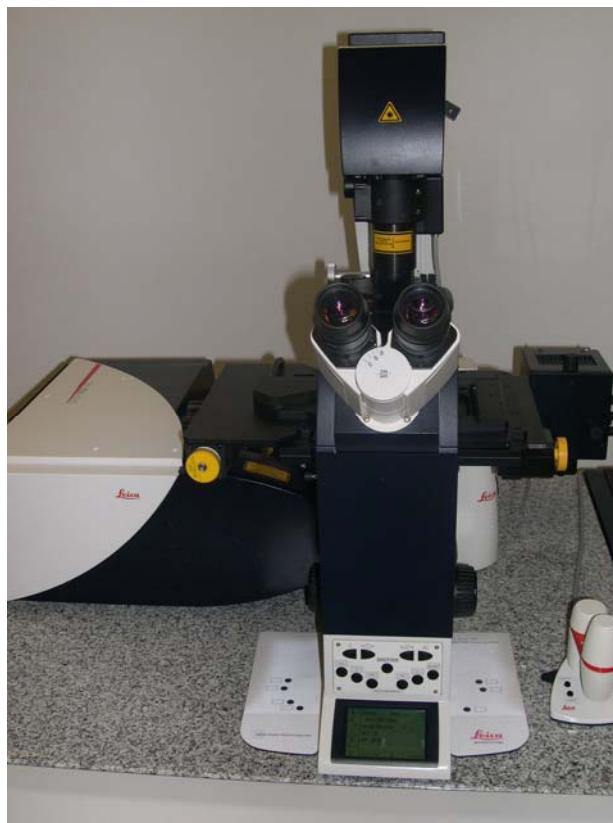
g- éteindre la lampe mercure

h- **Attention:** la ventilation du laser s'arrête automatiquement, c'est audible. A partir de ce moment et uniquement à partir de ce moment, éteindre sur le controleur le "Laser Power". Encas de doute, ne pas éteindre ce dernier bouton.



Seulement à la fin de la ventilation automatique

Microscope inversé DMI6000

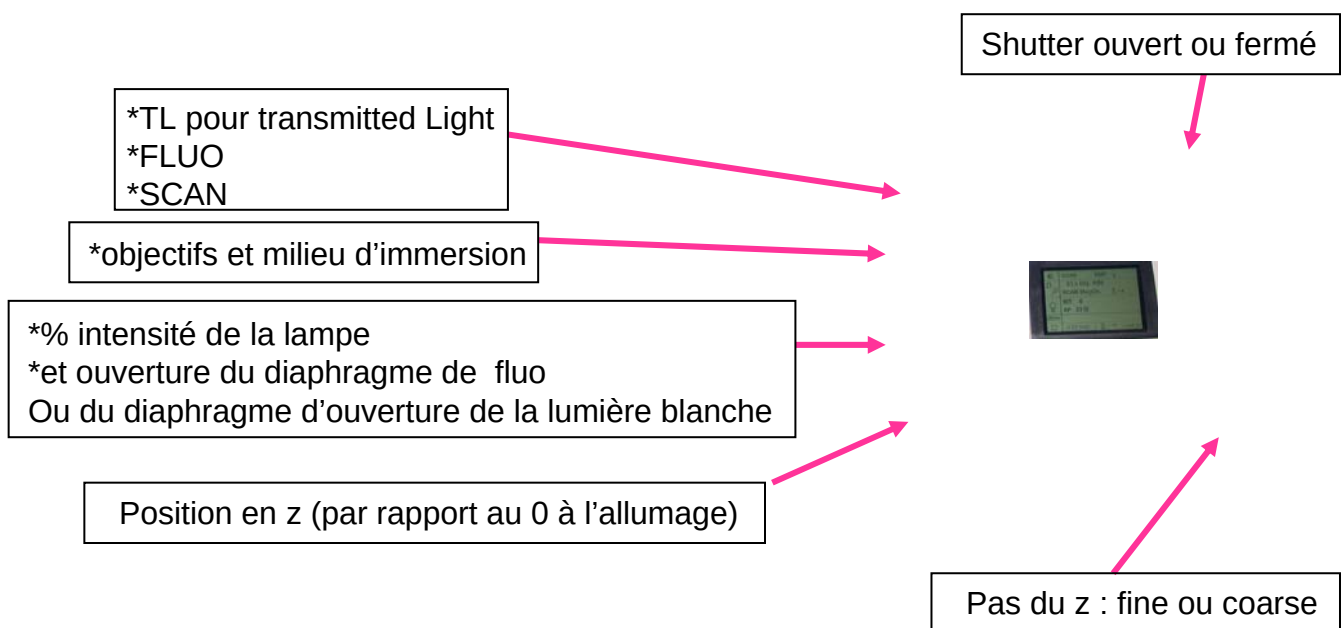


Face avant

*Blocs filtres



*Ecran d'information (non tactile)



Côté droit

* Changement d'objectif



Changement d'objectifs
(plus gros grossissement)

Changement d'objectifs
(plus petit grossissement)

Côté gauche

Lumière transmise : BF (bright field), POL (polariseur), DIC (polariseur et analyseur)

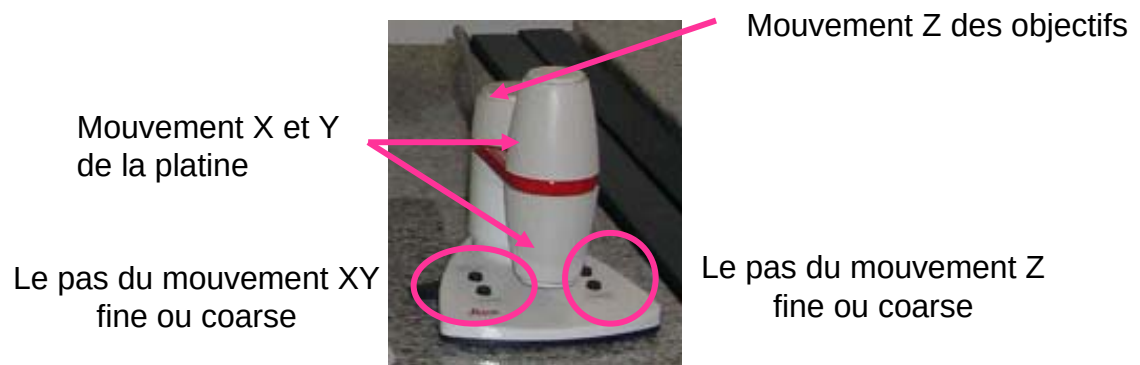
Variation de l'intensité
de la lampe "blanche" ou de la lampe "fluo"
bouton haut pour augmenter, bouton bas pour diminuer



Passage de lumière blanche (TL pour transmitted light)
à la fluo (IL pour illuminated light)

Ouverture des diaphragmes : bouton gauche pour ouvrir, bouton droit pour fermer
FD: field diaphragm : diaphragme de champ : pour la fluo : forme ronde ou rectangle
AP: aperture : diaphragme d'ouverture pour la lumière transmise

Le Joystick



Résolution optique en microscopie confocale

résolution latérale : $D_{xy} = 0,46\lambda/NA$

résolution axiale : $D_{xz} = 1,4\lambda/NA^2$

λ : longueur d'onde d'émission

NA : ouverture numérique de l'objectif (inscrit sur l'objectif après le grossissement)

Objectif 20X - 0.7 NA immersion huile

Longueur d'onde d'émission	450 nm	500 nm	580 nm	650 nm
Résolution XY	0.295µm	0.328µm	0.381µm	0.427µm
Echantillonnage du pixel	0.128µm	0.142µm	0.165µm	0.186µm
Résolution z	1.285µm	1.428µm	1.657µm	1.857µm
Echantillonnage du pas en z	0.559µm	0.621µm	0.720µm	0.807µm

Objectif 40X – 1.25 NA immersion huile

Longueur d'onde d'émission	450 nm	500 nm	580 nm	650 nm
Résolution XY	0.165µm	0.184µm	0.213µm	0.239µm
Echantillonnage du pixel	0.072µm	0.080µm	0.092µm	0.104µm
Résolution z	0.608µm	0.676µm	0.784µm	0.879µm
Echantillonnage du pas en z	0.264µm	0.294µm	0.341µm	0.382µm

Objectif 63X – 1.4 NA immersion huile

Longueur d'onde d'émission	450 nm	500 nm	580 nm	650 nm
Résolution XY	0.147µm	0.164µm	0.190µm	0.213µm
Echantillonnage du pixel	0.064µm	0.071µm	0.082µm	0.093µm
Résolution z	0.321µm	0.357µm	0.414µm	0.464µm
Echantillonnage du pas en z	0.140µm	0.155µm	0.180µm	0.202µm